

## XXXII. OTDK Biológia Szekció

Anyai plazma mikroRNS-ek felhasználásának vizsgálata a  
veleszületett szívfejlődési rendellenességek kimutatásában

*Szerző:* Biró Orsolya

*Intézmény:* Pázmány Péter Katolikus Egyetem

Információs Technológiai és Bionikai Kar

*Szak:* Orvosi Biotechnológia MSc, II. évfolyam

*Kutatóhely:* Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és

Nőgyógyászati Klinika

*Témavezető:* Dr. Nagy Bálint

*Belső konzulens:* Dr. Gáspári Zoltán



## TARTALOMJEGYZÉK

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....                                        | 3  |
| 1 BEVEZETÉS .....                                                 | 4  |
| 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....                                       | 5  |
| 2.1 Veleszületett szívfejlődési rendellenességek .....            | 5  |
| 2.2 Prenatális diagnosztika .....                                 | 7  |
| 2.2.1 Prenatális diagnosztikai módszerek .....                    | 7  |
| 2.2.2 A veleszületett szívfejlődési rendellenességek szűrése..... | 8  |
| 2.3 MikroRNS-ek .....                                             | 9  |
| 2.3.1 A mikroRNS-ek általános jellemzői .....                     | 9  |
| 2.3.2 A mikroRNS-ek szerepe a szívfejlődésben.....                | 10 |
| 2.3.3 A keringésben fellelhető mikroRNS-ek .....                  | 11 |
| 3 CÉLKITŰZÉSEK .....                                              | 12 |
| 4 VIZSGÁLATI ALANYOK ÉS MÓDSZEREK .....                           | 13 |
| 4.1 Vizsgálati alanyok .....                                      | 13 |
| 4.2 Módszerek .....                                               | 13 |
| 4.2.1 Vértétel és plazma elválasztás .....                        | 13 |
| 4.2.2 MiRNS extrakció.....                                        | 13 |
| 4.2.3 RNS koncentráció meghatározás .....                         | 16 |
| 4.2.4 MiRNS pool-ok elkészítése.....                              | 16 |
| 4.2.5 MiRNS PCR Array vizsgálat .....                             | 17 |
| 4.2.6 Bioinformatikai analízis .....                              | 21 |
| 5 EREDMÉNYEK .....                                                | 22 |
| 5.1 A miRNS PCR Array eredményei.....                             | 22 |
| 5.2 A bioinformatikai analízis eredményei.....                    | 24 |
| 6 ÉRTÉKELÉS .....                                                 | 27 |
| 7 ÖSSZEFOGLALÁS.....                                              | 30 |
| 8 IRODALOMJEGYZÉK.....                                            | 31 |
| 9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....                                        | 35 |

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

AMI: Akut Myocardialis Infarctus

beta-hCG: beta human chorionic gonadotropin

cDNA: complementary DNA, komplementer DNS

cff-DNA: cell free fetal DNA, szabad magzati DNS

CH: Cardialis hypertrophia

CM: Cardiomyopathia

CVS: Chorionic Villus Sample, chorionboholy-mintavétel

DCM: Dilatált cardiomyopathia

EDTA: Ethylenediamine Tetraacetic Acid, etilén-diamin-tetraecetsav

FC: Fold Change, expressziós szintváltozás

GO: Gene Ontology

hiPSC: human induced Pluripotent Stem Cells, humán eredetű indukált pluripotens őssejtek

HLHS: Hypoplastic Left Heart Syndrome, Hypoplasticus balszívfél szindróma

MI: Myocardialis Infarctus

miRISC: miRNA-induced silencing complex

mRNS: messenger RNS

miRNS: mikroRNS

miRTC: miRNA Reverse Transcription Control

NGS: Next Generation Sequencing, újgenerációs szekvenálás

PAPP-A: Pregnancy Associated Plasma Protein A

PCR: Polymerase Chain Reaction, polimeráz láncreakció

PPC: Positive PCR Control

pre-miRNS: prekursor miRNS

pri-miRNS: elsődleges (primary) miRNS átírat forma

RISC: RNA-induced silencing complex, RNS-indukált csendesítő komplex

RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction, valós idejű polimeráz láncreakció

SOLiD: Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection

TOF: Tetralogy Of Fallot, Fallot tetralógia

TRBP: Tar RNA Binding Protein

VSD: Ventricular Septum Defect, Kamrai sövénydefektus

VSzR: Veleszületett Szívfejlődési Rendellenesség

3' UTR: 3' Untranslated Region, 3' nem transzlálódó régió

## 1. BEVEZETÉS

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek a leggyakoribb születési defektusokhoz tartoznak és vezető okai a gyermekkori elhalálozásnak. A rendellenesség súlyosságától és sebészeti korrigálhatóságától nagymértékben függ a gyermek várható élettartama, ezért fontos a terhesség alatti felismerés. A betegség prenatális diagnosztikája magzati echokardiográfia alapján történik. A vizsgálat nem tartozik a rutin szűrőmódszerek közé, továbbá megbízhatósága több paramétertől is függ. Nagy az igény az olyan biomarkerekre, amelyeket a magzati szívultrahanggal kombinálva növelhető a vizsgálat diagnosztikus értéke.

Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak, melyek egyszerű vérvétellel hozzáférhetőek, tehát vizsgálatuk nem jelent a magzatra nézve veszélyt. A mikroRNS-ek (miRNS) olyan rövid, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, melyek fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének poszttranszkripciószabályozásában. Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben. Számos olyan található közöttük, amely a részt vesz a szívfejlődés szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel. Az ilyen tulajdonságokkal rendelkező miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában.

2013 januárja óta végzek tudományos diákkörös munkásságot a Semmelweis Egyetem I.sz. Nőgyógyászati és Szülészeti Klinikán, témám a miRNS-ek vizsgálata szívfejlődési rendellenességet mutató magzatok anyai plazma mintáiból. Részletesebben foglalkoztunk a *let-7c* miRNS-sel, mivel azt feltételeztük, hogy részt vesz a szívfejlődés szabályozásában. Az előzetesen végzett vizsgálatok eredményeként azt kaptuk, hogy a *let-7c* miRNS jelentősen upregulálódott a beteg magzatot hordozó várandósok plazma mintáiban

A jelen dolgozatban tárgyalt kutatást a Seconda Università di Napoli, Facoltà de Medicine e Chirurgia, Nápolyi orvosi egyetemével közreműködve végeztük el. Az olasz kutatócsoport a miRNS-ek szívfejlődésben játszott szerepét részletesen tanulmányozta, amellyel kapcsolatban 2014 elején cikkük is megjelent „Cardiomyogenesis is controlled by the *mir-99a/let-7c* cluster and epigenetic modifications” címmel a Stem Cell Research folyóiratban. A tanulmány megerősítette a *let-7c* miRNS szabályozó szerepét, és indokoltta a további vizsgálatok elvégzését. Felkerestem a cikk kapcsolattartó szerzőjét, Dr. Gilda Cobellis-t, és megbeszéltük, hogy 2014 nyarán csatlakozom a kutatócsoportjukhoz szakmai gyakorlat keretében. A kutatás során széles spektrumú miRNS expressziós vizsgálatokat végeztünk, és további potenciális biomarkereket kerestünk a szívfejlődési rendellenességek kimutatására.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 Veleszületett szívfejlődési rendellenességek

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek (VSzR) olyan anatómiai vagy funkcionális eltérések, melyek az embrionális fejlődés során alakulnak ki. A leggyakoribb születési defektusokhoz tartoznak, az élve születések körülbelül 1%-ában fordulnak elő és a perinatális elhalálozások 40%-át adják. A betegséggel sújtott újszülöttek több mint felének kritikus az állapota és legtöbbször sebészeti beavatkozásra van szükségük [1].

A VSzR kialakulásának pontos mechanizmusa nem ismert, külső tényezők és genetikai okok egyaránt hozzájárulhatnak. A kromoszóma rendellenességek, mint például a Down- és Edwards-szindróma, gyakran társulnak a szív hibás fejlődésével [2]. Génmutáció az esetek 3%-ában fordul elő, szintén többnyire valamely szindróma részeként (úgynevezett „syndromic heart disease”). Előfordulnak domináns, recesszív és nemhez kötött öröklődésmenetet mutató formák is. A kórképek egy kisebb hányada önállóan fordul elő, ezek gyakran monogénes öröklődést mutatnak (úgynevezett „non-syndromic heart disease”) [3].

A külső behatásokra a magzati szív a fejlődés legintenzívebb szakaszában, a terhesség 4-6. hete között a legérzékenyebb. Ezek közé tartoznak a vírusfertőzések (például rubeola), a teratogén anyagok (például alkohol és citosztatikumok), az oxigénhiány (például anyai dohányzás) illetve az ionizáló sugárzás (például röntgen).

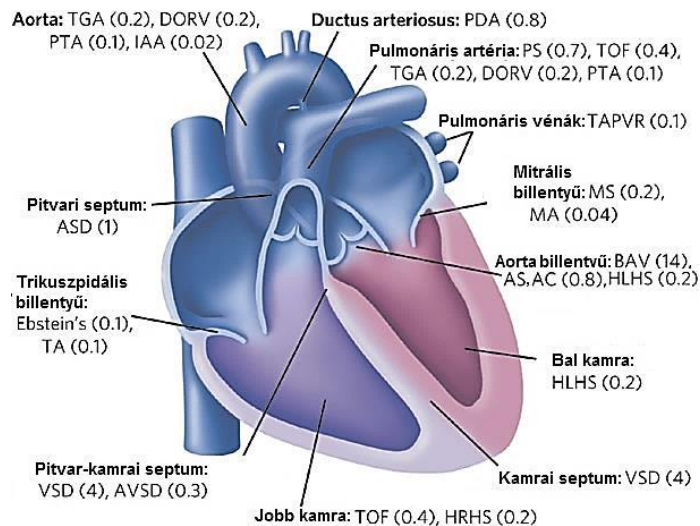
A fejlődési rendellenességek a szív különböző részeit érinthetik és a kis eltérésektől (minor anomáliák) a halálos kimenetelt okozó formákban is jelentkezhetnek (1. Ábra). A defektusok mechanizmusukat tekintve három nagy kategóriára oszthatók fel: újszülöttkori cianózishoz vezető szívfejlődési rendellenességek, balszívfelet érintő szívhibák és a szívsvény (septum) képződés zavarai [4]. A cianózissal (kékes bőrszín, melyet a vér alacsony oxigénszintje okoz) járó kórképek közé tartozik többek között a Fallot-tetralógia, a pulmonaris atresia és a nagy erek transzpozíciója. A második csoportba sorolható a hypoplasias balszívfél szindróma, a mitrális és az aorta stenosis. A septum hiány kiterjedhet a pitvari, a kamrai, illetve a centrális szívsvényre is.

#### A dolgozatban vizsgált betegségek:

1. Kamrai septum defektus (VSD, Ventricular Septal Defect): A leggyakoribb szívfejlődési rendellenesség, a két kamra közötti svényen lévő folyamatossági hiánnyal jellemezhető.
2. Hypoplasias balszívfél szindróma (HLHS, Hypoplastic Left Heart Syndrome): Rendkívül súlyos, összetett rendellenesség, mely a balszívfél különböző részeinek (aorta,

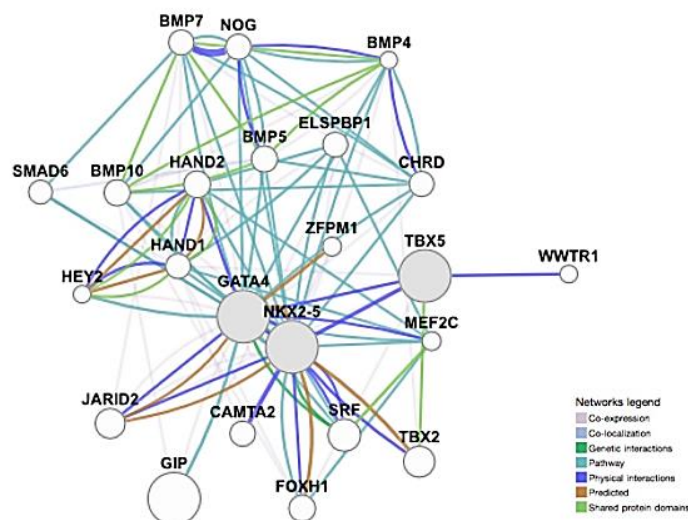
aortabillentyű, mitralis billentyű, bal kamra, bal pitvar) esetenként eltérő mértékű fejlődési hibájával jellemezhető.

3. Fallot tetralógia (TOF, Tetralogy Of Fallot): Kombinált szívfejlődési rendellenesség, mely a kamrai sövényhiány, a megnagyobbodott jobbkamra, az úgynevezett lovagló aorta valamint a nagyerek szűkülésének együttes előfordulásával jár.



**1. Ábra.** Szívfejlődési rendellenesség felosztása és gyakoriságuk 1000 élveszületésben [4]

A magzati szív-és érrendszer fejlődése különböző transzkripciós faktorok irányítása alatt áll (2. Ábra), melyek a szignál transzdukciós jelátviteli rendszerek utasításait a génexpresszió szabályozásán keresztül valósítják meg [3]. Ha a hálózat valamely eleme károsodik, például mutáció által, szívfejlődési rendellenesség alakulhat ki (1. Táblázat).



**2. Ábra.** Szívfejlődésben szerepet játszó transzkripciós faktorok interakciós hálózata [3]

| Betegség | Érintett gének                                                                           |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| VSD      | <i>NKX2-5, GATA4, CFC1, IRX4, ZIC3, TDGF1, CITED2, TBX20</i>                             |
| ASD      | <i>NKX2-5, GATA4, GATA6, TBX20, CFC1, CITED2</i>                                         |
| AVSD     | <i>NODAL, GATA4, ACVR1, CRELD1, CFC1, LEFTY2</i>                                         |
| PS       | <i>ELN, GATA4, ACVR2B, ZIC3, GATA6</i>                                                   |
| TOF      | <i>Nkx2-5, NODAL, CFC1, FOXH1, GATA4, FOG2, GDF1, HAND2, ALDH1A2, GATA6, TDGF1, JAG1</i> |
| HLHS     | <i>NOTCH1, NKX2-5, GJA1, ZIC3</i>                                                        |
| TGA      | <i>NODAL, FOXH1, CFC1, THRAP2, GDF1, ACVR2B, ZIC3, NKX2-5, MYH6</i>                      |

**1. Táblázat.** Szívfejlődési rendellenességek és mutációk

A kongenitális szívhibák súlyosságától és sebészeti korrigálhatóságától nagymértékben függ a gyermek várható élettartama, ezért nagyon fontos a terhesség alatti felismerés. Az idejében detektált defektusok esetében megfelelő felkészüléssel javíthatók a csecsemőkorai ellátás körülményei és bizonyos esetekben adott a korai korrekciós műtétek lehetősége [5]. A szívsebészeti beavatkozásoknak köszönhetően elkerülhetők az olyan, oxigenizációs zavar által kiváltott másodlagos következmények, mint például az idegrendszer károsodása. A műtétek sikeressége nagyban függ a megfelelő betegkiválasztástól és a sebész szakképzettségétől, ez magyarázza a gyakori komplikációkat és a nagy mortalitást [6].

## 2.2 Prenatális diagnosztika

### 2.2.1 Prenatális diagnosztikai módszerek

A prenatális diagnosztikai módszerek segítségével információt nyerhetünk az embrió, illetve a magzat egészségi állapotáról. Nemzetközi adatok szerint a csecsemőkorai elhalálozások 30%-ában veleszületett rendellenességek játszanak szerepet [7]. A különböző módszerek segítségével felismerhetővé váltak olyan magzati rendellenességek, amelyek méhen belüli, esetleg korai újszülöttkori kezelést tesznek szükségessé. Gyógyíthatatlan esetekben, a hatályos törvényeknek megfelelően adott a terhesség megszakításának lehetősége is, melynek elvégzéséről a szülők saját meggyőződésük szerint dönthetnek.

A terhesség alatt végzett szűrő és diagnosztikai vizsgálatokat invazív és non-invazív csoportba sorolhatjuk. Az ultrahang-és szérumerker-tesztek segítségével kiszűrhetőek azok a veszélyeztetett várandósok, akiknél az invazív vizsgálatok elvégzése indokolt. A magzat genetikai vizsgálatához szükséges mintavételi módszerek (chorionboholy-, magzatvíz-, magzati szövet- és köldökzsinórvér-mintavétel) különböző mértékű vetélskockázattal járnak. A magzatvíz mintavételt (amniocentézis) a 16-18. terhességi héten végzik, a beavatkozás szövödményeinek aránya 0,5% körüli [8]. Az így nyert mintát elsősorban citogenetikai

vizsgálathoz alkalmazzák, melynek elvégzése átlagosan két hetet is igénybe vehet. A chorionboholy-mintavételt (CVS) a 10-12. héten hajtják végre, 1,5-2%-ban vezethet spontán vetéléshez [7,8]. Az invazív eljárásokkal nyert magzati mintákból különböző laboratóriumi módszerekkel direkt információt nyerhetünk a magzatról.

Egyre nagyobb az igény olyan diagnosztikai eljárások kifejlesztésére, melyek alkalmazása során az invazív vizsgálatok során felmerülő kockázat kiküszöbölhető. Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű szabad nukleinsavak, melyek terhesség alatt az összes szabad nukleinsav körülbelül 5%-át adják [9]. Fő forrásuk a méhlepény trophoblastsejtjeinek apoptózisa, melyek az anyai és magzati felszínek közötti érintkezési határfelületet képezik. Ezek a sejtek a terhesség alatt folyamatos kapcsolatban állnak az anyai vérrel illetve szövetekkel, genetikai állományuk megegyezik a magzatéval [9]. A szabad nukleinsavak egyszerű vérvétellel hozzáférhetőek, vizsgálatuk nem jelent a magzatra nézve veszélyt, ezért non-invazívnek tekintjük. Az úgynevezett cff-DNS felhasználási lehetőségeit régóta vizsgálják, olyan esetekben alkalmazható prenatális diagnosztikai célra, amikor az anya és a magzat genetikai állományában kimutatható különbség van. Napjainkban már több alkalmazása is létezik: magzati nem (nemhez kötött betegségek szűrésére) és vércsoport meghatározás, apai allél által meghatározott örökletes betegségek és számbeli kromoszóma eltérésék szűrése [10].

### **2.2.2 A veleszületett szívfejlődési rendellenességek szűrése**

Az általános szülészeti ultrahang-szűrővizsgálat része a magzati szív négyüreges síkjának és kiáramlási pályáinak a vizsgálata. Ezzel a módszerrel a súlyos szívfejlődési rendellenességek megközelítően 40%-a detektálható [11]. A szülészeti ultrahangon kóros eltérést mutató, illetve egyéb nagy rizikójú terhességekben indokolt a részletes magzati echokardiográfiai (szívuultrahang) vizsgálat elvégzése is. A magzati okok mellett a javallat alapját képezheti még családi anamnézis (genetikai okok), anyai kórtörténet (például diabetes mellitus, fenilketonuria) és különböző teratogén ártalmak (például drogok, fertőzések). Bizonyos kockázati tényezők gyakrabban társulnak veleszületett szívhibával, habár az esetek döntő részénél nem mutatható ki semmilyen ismert rizikófaktor. A módszer megbízhatósága több paramétertől függ, mint például az anyai hasfal vastagsága, az ultrahang berendezés minősége és a gyermekkardiológus szakképzettsége [12]. A vizsgálatot a 18-22. terhesség hét között végzik, amikor a szív már elért egy bizonyos érettségi szintet és a terhesség esetleges terminálása még nem ütközik jogi korlátokba [13].

Széles körűen elterjedt a nyaki redő vastagságának a mérése [14], továbbá összefüggést mutattak ki egyes, a terhesség alatt vizsgált szérumban markerek (beta-hCG és PAPP-A) és a veleszületett szívhibák megjelenése között [15], de ezek nem elég specifikusak a betegségre nézve.

## **2.3 MikroRNS-ek**

### **2.3.1 A mikroRNS-ek általános jellemzői**

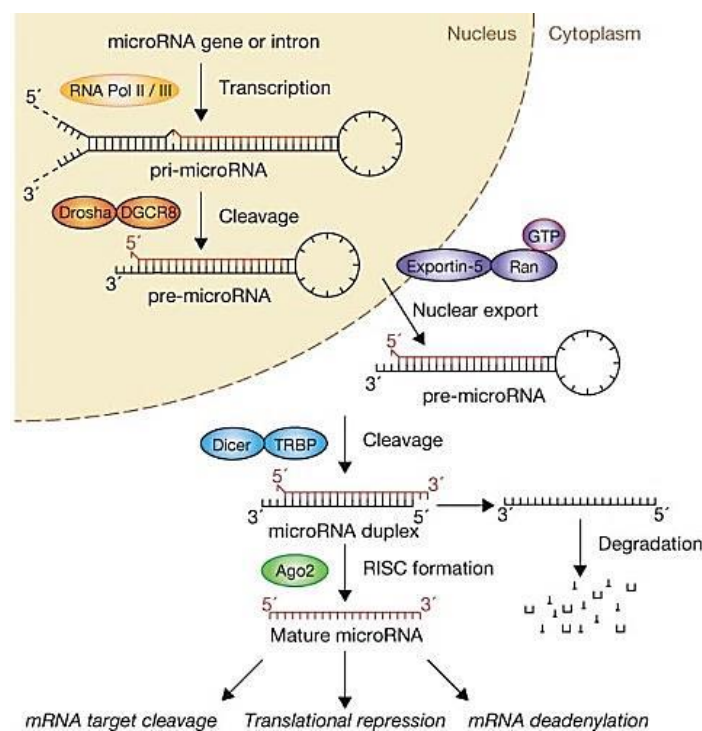
A mikroRNS-ek (miRNS) rövid 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló RNS molekulák. Fontos szerepet töltenek be az eukarióta gének expressziójának poszttranszkripciós szabályozásában, hatásukat negatív reguláció révén fejtik ki: az mRNS szekvenciák nem transzlálódó végéhez (3'UTR) kötődve gátolják annak transzlációját [16].

A miRNS 5' vége tartalmazza az mRNS szekvenciával komplementer, 7 nukleotid hosszúságú úgynevezett „seed” régiót. Egy miRNS-nek több száz különböző célgénje lehet, illetve egy adott cél-mRNS számos miRNS-kötőhelyet is tartalmazhat [16]. Becslések szerint a humán genom több mint 1000 miRNS-t kódol, és a fehérje gének körülbelül 1/3-a miRNS-szabályozás alatt áll. A miRNS-ek expressziós mintázatára tér- és időbeli specificitás jellemző. Olyan alapvető élettani folyamatok finomhangolásában vesznek részt, mint a sejtciklus, a proliferáció, a differenciáció és a sejthalál [17].

A miRNS-eket kódoló gének a genom intra- és intergénikus régióiban találhatóak. A legtöbb esetben a fehérjét kódoló gének intronikus szakaszain lokalizálódnak, amelyek a transzkripció során kivágódnak az mRNS előalakból. Ezek a miRNS gének a kódoló exonokkal azonos, "értelmes" DNS szálon helyezkednek el, és mivel önálló promóterrel nem rendelkeznek, ezért "gazda" génnel együtt íródnak át. A miRNS-eket kódoló gének kisebb része önálló transzkripciós egységként működik, ezek a genom nem kódoló, intergénikus régióiban találhatóak. [17]

A miRNS-ek prekursor alakja az mRNS-ektől eltérően kettős szálú, többlépcsős érési folyamat során válnak egyszálúvá (3. Ábra). Transzkripciójában a II-es típusú RNS polimeráz vesz részt, amely először egy úgynevezett „hajtűprekuzort” hoz létre, a primer miRNS-t (pri-miRNS). A pri-miRNS-t még a sejtmagon belül egy III-as típusú endoribonukleáz, a DROSHA és kofaktora, a DGCR8 hasítja el. A keletkező körülbelül 70 nukleotid hosszú intermedier terméket pre-miRNS-nek nevezzünk. Ezután az Exportin-5 és kofaktora, a Ran-

GTP kijuttatja a pre-miRNS-t a sejtmagból a citoplazmába, ahol egy második ribonukleáz, a DICER és kofaktora, a TRBP (Tar RNA binding protein) eltávolítja róla a terminális hurkot, egy 20-24 nukleotid hosszúságú kettős szálát eredményezve. A duplex ezután egy Argonauta fehérjével kapcsolódik, majd a cél-mRNS-sel komplementer szál („guide strand”) kiválasztódásával létrejön az effektor funkciót ellátó miRISC (miRNA-induced silencing complex) ribonukleoprotein-komplex. A másik szál („passenger strand”) a folyamat során kiválik a komplexből és degradálódik [18].



3. Ábra. A miRNS-ek érési folyamata és szabályozási mechanizmusa [18]

A miRISC komplex specifikusan kötődik az mRNS-hez, majd ennek következtében megvalósul a negatív reguláció. A poszttranszkripció gécscsökkentés ezen formájának állatokban és ember két fő hatásmechanizmusa létezik: 1) A miRNS kötődése az mRNS 3' nem transzlálódó régiójában a polyA farok deadenilációját, ezáltal szabad 3' véggel rendelkező mRNS kialakulását okozza; 2) A miRISC komplex a riboszómális 60S alegység kapcsolódásának akadályozásán keresztül gátolja a transzláció iniciációját [18].

### 2.3.2 A mikroRNS-ek szerepe a szívfejlődésben

Az elmúlt években számos olyan specifikus miRNS-t azonosítottak, melyek részt vesznek a szívfejlődés folyamatának szabályozásában. Ezek közé tartozik a széles körben tanulmányozott izomspecifikus *miR-1/miR-133* klaszter, melynek tagjai ellentétes hatást

fejtenek ki a kardiogenezis folyamán: a *miR-1* elősegíti az epithelium sejtek szívizomsejteké váló differenciációját, míg a *miR-133* gátolja ugyanezt a folyamatot [19]. Az úgynevezett „myomiR”-ok (*miR-208a*, *miR-208b* és *miR-499*) nevüket az őket kódoló myosin génekről kapták. Olyan folyamatok finomhangolásában vesznek részt, mint a kardiális remodeling és az izomrostok myosin koncentrációjának meghatározása [20]. A szív-és érrendszerben konstitutívan expresszáldó *miR-143* és *miR-145* döntő szerepet játszik a VMSC (Vascular Smooth Muscle Cell, vaszkuláris simaizomsejtek) fenotípusának modulációjában és vascularisatio (ereződés, érképződés) folyamatának szabályozásában [21].

A *let-7* miRNS család tagjai konstitutívan expresszáldnak a szív- és érrendszer főbb sejtjeiben, beleértve a vaszkuláris simaizomsejteket, az endothel sejteket és a koszorúér simaizomsejtjeit [22]. Babiarz és munkatársai 2012-ben hiPSC (human induced pluripotent stem cells) eredetű szívizomsejteken transzkriptomikai vizsgálatot végeztek, melynek eredményeül azt kapták, hogy a *let-7* miRNS család egy fontos csomópontja a cardiomyocita differenciációt szabályozó miRNS-mRNS hálózatnak [23]. A *let-7c* a 21-es kromoszóma q21.2 régiójában helyezkedik el. Coppola és munkatársai 2013-ban kísérletesen bebizonyították, hogy a *let-7c* részt vesz a cardiomyogenesis szabályozásában: célpontja egy olyan metil-transzferáz enzim (*Ezh2*), amely kulcsfontosságú, szívfejlődést szabályozó transzkripció faktorokat csendesít (ezáltal a miRNS serkenti a folyamatot) [24]. A Down-szindróma, más néven 21-es triszómia gyakran társul szívfejlődési rendellenességgel, ezért összefüggés feltételezhető a *let-7c* megemelkedett kópiaszáma és a szívhibák megjelenése között.

### **2.3.3 A keringésben fellelhető mikroRNS-ek**

A humán plazmában fellelhető miRNS-ek szintje relatíve állandó és a különböző egyének között konzisztens. Stabilitásukat megőrzik olyan szélsőséges körülmények között is, mint a többszöri fagyasztási-olvasztási ciklusok, a magas, illetve alacsony pH és a hosszú tárolási idő [25]. Ezen tulajdonságainak köszönhetően, a keringő miRNS-ek potenciális biomarkerként szolgálhatnak különböző kórképek kimutatására.

Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszáldnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben [26]. Számos olyan található közöttük, amely a részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel [27]. Az ilyen tulajdonságokkal rendelkező, magzati eredetű miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

A kutatás során célkitűzésünk volt a miRNS-ek szívfejlődésben játszott szerepének vizsgálata; a szívfejlődési rendellenességgel kapcsolatos miRNS-ek expressziós mintázatának elemzése anyai plazmában; végső soron potenciális miRNS biomarkerek keresése a betegség kimutatására.

A feladataim a következők voltak:

- Irodalomkutatás végzése a szívfejlődési rendellenességekről és születés előtti kimutatási lehetőségeiről, a miRNS-ek szívfejlődésben játszott szerepéről és biomarkerként való felhasználásáról;
- A vizsgálatban résztvevő várandósok adatainak (anya súlya, kora, az eddigi és a jelen terhességre vonatkozó adatok, szérum biomarkerek, magzati echokardiográfia és intrauterin karyotipizálás során felállított diagnózis stb.) összesítése;
- Az anyáktól származó perifériás vérmintákból plazma izolálása centrifugálással, majd abból miRNS extrakció végrehajtása a *NucleoSpin miRNA Plasma (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország)* felhasználásával;
- Az így kapott mintákban össz-miRNS-koncentráció meghatározása *Nanodrop 1000* spektrofotométer (*Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA*) segítségével;
- A magzati echokardiográfia, illetve az intrauterin karyotipizálás során felállított diagnózis alapján miRNS pool-ok készítése az egyes defektusoknak megfelelően;
- Az ily módon nyert mintákon miRNS PCR Array analízis elvégzése, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával (*Human Cardiovascular Disease miRNA PCR Array, Qiagen GmbH, Hilden, Németország*);
- Annak megállapítása, hogy az egyes betegcsoportokban mely miRNS-ek mutatnak fokozott- vagy csökkent expressziót az életkor szerint illesztett normál csoportokhoz képest;
- Bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével lehetséges biológiai magyarázatok keresése a megfigyelt változásokra.

## **4. VIZSGÁLATI ALANYOK ÉS MÓDSZEREK**

### **4.1 Vizsgálati alanyok**

2013. január és 2014. május között perifériás vérmintákat gyűjtöttünk a Semmelweis Egyetem I.sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán terhesgondozásban résztvevő várandósoktól. A kutatás elvégzéséhez engedélyt kértünk a Semmelweis Egyetem Etikai bizottságától. A vizsgáló orvos szóban és írásban tájékoztatta a vizsgálat alanyait, akik ezután írásbeli beleegyező nyilatkozatot tettek a vérminták további felhasználásáról.

A vizsgálatban 79 várandós vett részt. A beteg csoportot 41 veleszületett szívfejlődési rendellenességet mutató magzatot hordozó anya alkotta. A diagnózis felállítása magzati echokardiográfia alapján történt, az elvetélt magzatok esetében fetopathológiai vizsgálattal megerősítették a defektusok jelenlétét. A kóros terhességek egy részében magzatvíz mintavételt követően citogenetikai vizsgálat is történt, melynek segítségével kiszűrhetőek a kromoszóma-rendellenességek. 12 esetben igazolódott aneuploidia, ezek közül 3 db 18-as triszómia (Edwards-szindróma) és 9 db 21-es triszómia (Down-szindróma) volt. A beteg csoportban az átlag életkor  $33\pm 6$  év volt, a triszómiás magzatot hordozó anyák életkora magasabb,  $37\pm 4$  év volt. A kontroll csoportot 38 egészséges magzatot hordozó anya alkotta, akiknél a rutin szülészeti ultrahang vizsgálat során nem mutatkozott kóros eltérés. A kontroll csoportban az átlag életkor  $33\pm 4$  év volt.

### **4.2 Módszerek**

#### **4.2.1 Vérvétel és plazma elválasztás**

Az anyai perifériás vérmintákat zárt vérvételi rendszer segítségével vettük le. A mintákat EDTA tartalmú csövekbe gyűjtöttük, hogy megakadályozzuk a véralvadást. Az  $K_3$ -EDTA a  $Ca^{2+}$  és  $Mg^{2+}$  ionok megkötése által fejti ki antikoaguláns hatását, továbbá gátolja az endogén nukleázok aktivitását.

A vérmintákból Eppendorf 5810 R (Eppendorf AG, Hamburg, Németország) típusú centrifuga segítségével elválasztottuk a plazmát. A mintákat 10 percig  $2,500\times g$ -n, majd a leszívott felülészót 10 percig  $15,500\times g$ -n centrifugáltuk. Az így nyert plazmamintákat 1.5ml-es Eppendorf csövekben,  $-80^{\circ}C$ -on tároltuk a további feldolgozásig.

#### **4.2.2 MiRNS extrakció**

A plazmából miRNS extrakciót végeztünk a NucleoSpin® miRNA Plasma (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország) kit felhasználásával, a gyártó leírásának

megfelelően. A módszer a hagyományos szerves oldószerekkel történő izolálást kombinálja a szilikamembrán alapú oszlopos technikával, így lehetővé válik a kisméretű RNS molekulák megkötése. A plazmából származó, membránon megkötött miRNS mosási lépéseket követően centrifugálással az oszlopról eltávolítható, és közvetlenül használható további kísérletekben. Az eljárás nagy előnye a hagyományos módszerekkel szemben, hogy az extrakció menete, főleg több minta esetén, gyorsabb és egyszerűbb.

A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- Lysis Buffer MLP: 15 mL
- Protein Precipitation Buffer MPP: 5 mL
- Reaction Buffer for rDNase: 3 mL
- rDNase, RNase-free (lyophilized): 1 üvegcsce
- Wash Buffer MW1: 10 mL
- Wash Buffer MW2 (Concentrate): 20 mL
- RNase-free H<sub>2</sub>O: 5 mL
- NucleoSpin® miRNA Columns: 50 db
- Collection Tubes (1.5 mL, lid): 50 db
- Collection Tubes (2 mL, lid): 50 db
- Collection Tubes (2 mL): 50 db

Egyéb szükséges reagensek:

- 96–100 % -os etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)
- Izopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)

Előkészítés:

1. A Wash Buffer MW2 koncentrátumhoz 80 mL ethanolt adunk, majd finoman összekeverjük. Szobahőmérsékleten (18-25°C) tárolható.
2. A liofilizált "RNase-free rDNase"-hoz 3 mL Reaction Buffer for rDNase-t adunk. 1 percig inkubáljuk szobahőmérsékleten, majd finoman összerázzuk (nem szabad centrifugálni, mert az enzim nagyon érzékeny a mechanikai behatásokra). A következő felhasználásig -20°C-on tároljuk.

Az izolálás lépései:

1. Minta előkészítése

Egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe 300 µl plazmamintát pipetázunk, hozzáadunk 90 µl denaturáló MLP puffert, 5 másodpercig keverjük, majd 3 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.

2. Fehérje kicsapása

30 µl MPP puffert adunk az elegyhez, 5 másodpercig keverjük, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 3 percig centrifugáljuk.

3. Felülúszó elválasztása

A felülúszót átvisszük egy új 2 ml-es gyűjtőcsőbe.

4. A nukleinsavak megkötéséhez szükséges feltételek megteremtése

400 µl izopropanolt adunk a mintához, majd 5 másodpercig keverjük.

5. DNS és RNS megkötése

A NucleoSpin® miRNA oszlopot egy 2 mL-es gyűjtőcsőbe helyezük, a mintát az oszlopra visszük, 2 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. A felülúszót leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

6. DNS emésztése

1. mosás: 700 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

2. mosás: 250 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 2 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

DNS emésztése: 50 µl rDNÁzt pipetázunk a membránra, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk.

7. A szilikamembrán mosása

1. mosás: 100 µl mosó MW1 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

2. mosás: 700 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 30 másodpercig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

3. mosás: 250 µl mosó MW2 puffert adunk a mintához, majd 11,000×g-n 2 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékot leöntjük, majd visszahelyezzük az oszlopot a csőbe.

8. RNS eluálása

A NucleoSpin® miRNA oszlopot egy új 1,5 mL-es gyűjtőcsőbe helyezük, 30 µl RNáz-mentes vizet pipetázunk a membránra, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáljuk, majd 11,000×g-n 1 percig centrifugáljuk. Az átszűrt folyadékban található az oszlopról leoldott miRNS, amelyet a további feldolgozásig -80°C-on tárolunk.

### 4.2.3 RNS koncentráció meghatározás

A kapott minták össz-miRNS koncentrációját *Nanodrop 1000* UV-VIS spektrofotométer (*Thermo Fischer Scientific Inc., Wilmington, USA*) segítségével határoztuk meg. RNA-40 beállítással dolgoztunk, és az egyes mérésekhez 1,5 µl mintát használtunk fel. A nukleinsavak abszorpciós maximuma 260 nm-es hullámhosszon látható, az elnyelés mértékéből kiszámítható a minta nukleinsav koncentrációja.

### 4.2.4 MiRNS pool-ok elkészítése

A különböző szív- és kromoszóma-rendellenességeknek megfelelően 5 beteg és 2 korosztály szerint megkülönböztetett, normál mintákból összeállított miRNS pool-t készítettünk (2. Táblázat). Az egyes mintákból 2 µl-t kevertünk össze, a pool-ok összterfoglata 12 µl volt. Amelyik csoportból nem állt rendelkezésre 6 db minta, azt RNáz-mentes vízzel egészítettük ki a következő módon:

- I. 21-es triszómia: 6x2µl miRNS
- II. 18-as triszómia: 3x2µl miRNS + 6µl H<sub>2</sub>O
- III. VSD: 6x2µl miRNS
- IV. HLHS: 5x2µl miRNS + 2µl H<sub>2</sub>O
- V. TOF: 2x2µl miRNS + 8µl H<sub>2</sub>O
- VI. Normál\_30-35: 6x2µl miRNS
- VII. Normál\_36-42: 6x2µl miRNS

| Minta |       |      | Terhesség adatai |                 | RNS koncentráció |
|-------|-------|------|------------------|-----------------|------------------|
| Pool  | Típus | Szám | Echokardiográfia | Citogenetika    |                  |
| 1     | beteg | 5    | AVSD             | 21-es triszómia | 4,45 ng/µl       |
| 1     | beteg | 70   | NI               | 21-es triszómia | 2,05 ng/µl       |
| 1     | beteg | 24   | HLHS             | 21-es triszómia | 5,35 ng/µl       |
| 1     | beteg | 17   | HLHS             | 21-es triszómia | 8,35 ng/µl       |
| 1     | beteg | 47   | NI               | 21-es triszómia | 2,20 ng/µl       |
| 1     | beteg | 46   | NI               | 21-es triszómia | 3,10 ng/µl       |
| 2     | beteg | 18   | VSD              | 18-as triszómia | 5,85 ng/µl       |
| 2     | beteg | 65   | NI               | 18-as triszómia | 2,60 ng/µl       |
| 2     | beteg | 69   | NI               | 18-as triszómia | 1,75 ng/µl       |
| 3     | beteg | 1    | VSD              | N               | 2,45 ng/µl       |
| 3     | beteg | 10   | VSD              | N               | 3,00 ng/µl       |
| 3     | beteg | 19   | VSD              | N               | 5,75 ng/µl       |
| 3     | beteg | 74   | VSD              | N               | 2,65 ng/µl       |
| 3     | beteg | 23   | VSD              | N               | 5,90 ng/µl       |
| 3     | beteg | 77   | VSD              | N               | 4,90 ng/µl       |
| 4     | beteg | 2    | HLHS             | N               | 6,50 ng/µl       |
| 4     | beteg | 9    | HLHS             | N               | 3,60 ng/µl       |
| 4     | beteg | 13   | HLHS             | N               | 2,90 ng/µl       |
| 4     | beteg | 15   | HLHS             | N               | 6,65 ng/µl       |

|   |          |    |      |   |             |
|---|----------|----|------|---|-------------|
| 4 | beteg    | 3  | HLHS | N | 10,60 ng/μl |
| 5 | beteg    | 20 | TOF  | N | 4,50 ng/μl  |
| 5 | beteg    | 12 | TOF  | N | 3,50 ng/μl  |
| 6 | kontroll | 27 | N    | N | 4,10 ng/μl  |
| 6 | kontroll | 31 | N    | N | 4,00 ng/μl  |
| 6 | kontroll | 50 | N    | N | 3,60 ng/μl  |
| 6 | kontroll | 62 | N    | N | 4,10 ng/μl  |
| 6 | kontroll | 43 | N    | N | 4,85 ng/μl  |
| 6 | kontroll | 59 | N    | N | 2,65 ng/μl  |
| 7 | kontroll | 34 | N    | N | 4,45 ng/μl  |
| 7 | kontroll | 52 | N    | N | 3,35 ng/μl  |
| 7 | kontroll | 63 | N    | N | 3,65 ng/μl  |
| 7 | kontroll | 28 | N    | N | 4,25 ng/μl  |
| 7 | kontroll | 68 | N    | N | 2,00 ng/μl  |
| 7 | kontroll | 41 | N    | N | 3,40 ng/μl  |

**2.Táblázat.** miRNS pool-ok felosztása és RNS koncentrációk

#### 4.2.5 MiRNS PCR Array vizsgálat

- **A vizsgálat működési elve**

Az anyai plazma mintákon miRNS PCR Array analízist végeztünk, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával: *Human Cardiovascular Disease miRNA PCR Array (Qiagen GmbH, Hilden, Németország)*, katalógusszám: *MIHS-113Z*. A panel 84 miRNS expressziós vizsgálatát teszi lehetővé, amelyek különböző szív-és érrendszeri megbetegedésekben, illetve szívfejlődési folyamatban a normálistól eltérő módon fejeződnek ki. Az egyes miRNS-ek meghatározó szerepét széles spektrumú kardiovaszkuláris betegség modellek, klinikai minták és sejtvonalak felhasználásával, korszerű kísérleti rendszerekben (microarray, RT-PCR, újgenerációs szekvenálás stb.) azonosították.

A miRNS PCR array felépítése a 4. Ábrán látható. A 12x8 soros plate-en az A-G sorokban helyezkednek el az értett miRNS specifikus forward primerek (miScript Primer Assays), a H sorban pedig az adatok normalizáláshoz szükséges próbák és egyéb kontrollok:

- Ce (C. elegans miR-39 miScript Primer Assay): szintetikus miRNS kontroll alternatív adat normalizációhoz
- SN1-6 (snoRNA/snRNA miScript PCR Controls): az adatok normalizálásához használt kontrollok a relatív kvantifikáció során ( $\Delta\Delta C_T$  módszer)
- miRTC (miRNA Reverse Transcription Control): A cDNS szintézis hatékonyságának mérésére szolgáló kontroll
- PPC (Positive PCR Control): A PCR reakció hatékonyságának mérésére szolgáló kontroll

|          | 01            | 02            | 03          | 04         | 05          | 06          | 07          | 08          | 09          | 10         | 11         | 12          |
|----------|---------------|---------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| <b>A</b> | let-7a-5p     | let-7b-5p     | let-7c-5p   | let-7d-5p  | let-7e-5p   | let-7f-5p   | miR-1       | miR-100-5p  | miR-103a-3p | miR-107    | miR-10b-5p | miR-122-5p  |
| <b>B</b> | miR-124-3p    | miR-125a-5p   | miR-125b-5p | miR-126-3p | miR-130a-3p | miR-133a-3p | miR-133b    | miR-140-5p  | miR-142-3p  | miR-143-3p | miR-144-3p | miR-145-5p  |
| <b>C</b> | miR-146a-5p   | miR-149-5p    | miR-150-5p  | miR-155-5p | miR-15b-5p  | miR-16-5p   | miR-17-5p   | miR-181a-5p | miR-181b-5p | miR-182-5p | miR-183-5p | miR-185-5p  |
| <b>D</b> | miR-18b-5p    | miR-195-5p    | miR-199a-5p | miR-206    | miR-208a-3p | miR-208b-3p | miR-21-5p   | miR-210-3p  | miR-214-3p  | miR-22-3p  | miR-221-3p | miR-222-3p  |
| <b>E</b> | miR-223-3p    | miR-224-5p    | miR-23a-3p  | miR-23b-3p | miR-24-3p   | miR-25-3p   | miR-26a-5p  | miR-26b-5p  | miR-27a-3p  | miR-27b-3p | miR-29a-3p | miR-29b-3p  |
| <b>F</b> | miR-29c-3p    | miR-302a-3p   | miR-302b-3p | miR-30a-5p | miR-30c-5p  | miR-30d-5p  | miR-30e-5p  | miR-31-5p   | miR-320a    | miR-328-3p | miR-342-3p | miR-365a-3p |
| <b>G</b> | miR-378a-3p   | miR-423-3p    | miR-424-5p  | miR-451a   | miR-486-5p  | miR-494-3p  | miR-499a-5p | miR-7-5p    | miR-92a-3p  | miR-93-5p  | miR-98-5p  | miR-99a-5p  |
| <b>H</b> | cel-miR-39-3p | cel-miR-39-3p | SNORD 61    | SNORD 68   | SNORD 72    | SNORD 95    | SNORD 96A   | RNU6-2      | miRTC       | miRTC      | PPC        | PPC         |

**4. Ábra.** miScript miRNS PCR Array felépítése, miScript Primer Assay-k

A panelen található miRNS-ek közül csak azokat vettük figyelembe, melyek kifejeződnek placentában is, ezáltal a keringésben jelenlévő szabad formájuk egy bizonyos hányada feltehetően magzati eredetű. A szöveti specificitásra vonatkozó adatokat a szakirodalomból [28-30] és internetes adatbázisok (*miRBase*: [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org), *miRDB*: [mirdb.org/miRDB/](http://mirdb.org/miRDB/)) felhasználásával gyűjtöttem ki.

A miRNS PCR Array kvantitatív RT-PCR rendszeren alapszik, ami az érett miRNS-ek specifikus és szenzitív kimutatását teszi lehetővé.

• **A vizsgálat kivitelezése**

**cDNS szintézis**

A szintézist a *miScript® II RT Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével végeztük el, a gyártó leírásának megfelelően.

**A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):**

- miScript Reverse Transcriptase Mix: 100 µl
- 5x miScript HiSpec Buffer: 400 µl (érett miRNS detekcióhoz)
- 5x miScript HiFlex Buffer: 400 µl (prekurzor miRNS detekcióhoz)
- 10x miScript Nucleics Mix: 200 µl
- RNase-free H<sub>2</sub>O: 1,9 ml

### A cDNS szintézis lépései:

#### 1. Reverz transzkripció master mix összeállítása

Összemérjük a cDNS szintézishez szükséges komponenseket az alábbi módon (a mennyiség egy mintára értendőek):

- 4 µl 5x miScript HiSpec Buffer
- 2 µl 10x miScript Nucleics Mix
- 10 µl RNáz-mentes víz
- 2µl miScript Reverse Transcriptase Mix
- 18 µl Reverz transzkripció master mix

#### 2. Templát hozzáadása

A mixhez 2 µl templát miRNS-t adunk, amivel elérjük a 20µl-es végtérfogatot.

#### 3. Futtatás

A futtatást a *Techne TC-412* thermocyclerrel (*Bibby Scientific Limited, Stone, UK*) hajtjuk végre: a mintát először 60 percig, 37°C-on, majd 5 percig, 95°C-on inkubáljuk.

#### 4. Hígítás

A reakció termékeként kapott mintákat 1:10 arányban felhígítjuk: 20µl cDNS-hez 200µl RNáz-mentes vizet adunk, majd finoman összekeverjük. A további feldolgozásig -20°C-on tároljuk.

### **RT-PCR**

A PCR reakciók elvégzéséhez *miScript® SYBR Green PCR Kitet* (*Qiagen GmbH, Hilden, Németország*) használtunk a gyártó leírásának megfelelően.

#### A kit tartalma (a gyártó elnevezése szerint):

- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: 3×1.7 ml
  - HotStarTaq® DNA Polymerase
  - QuantiTect SYBR Green PCR Buffer
  - dNTP mix
  - SYBR Green I
  - ROX™ passive reference dye
  - 5mM MgCl<sub>2</sub>
- 10x miScript Universal Primer: 1 ml
- RNase-free H<sub>2</sub>O: 2×2 ml
- 96-well plate containing dried assays
- Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (12 per plate)

### A RT-PCR reakció lépései:

#### 1. Reakció mix összeállítása

Összemérjük a RT-PCR elvégzéséhez szükséges komponenseket az alábbi módon:

2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix: 1375µl

10x miScript Universal Primer: 275µl

RNáz-mentes víz: 1000µl

Templát cDNS: 100µl

---

Végtérfogat: 2750µl

#### 2. PCR mix bemérése a miRNS PCR Array-be

Előkészítjük a miRNS PCR Array-t és a PCR mixből 25µl-t pipetázunk a plate minden lyukába (8×12).

#### 3. miRNS PCR Array lezárása

12 db vékonyfalú optikai lemezzel lefedjük a plate oszlopait (×8), majd 1000×g-on 1 percig centrifugáljuk.

#### 4. Futtatás

A RT-PCR reakciókat *BIO-RAD CFX384* típusú berendezéssel (*Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA*) hajtottuk végre, az alábbi beállításokkal:

Aktivációs lépés: 15 perc, 95°C

Denaturáció: 15 mp, 94°C

Anellálás: 30 mp, 55°C

Extenzió: 30 mp, 70°C

} ×40

### Kiértékelés

A RT-PCR reakciókat a *BIO-RAD CFX Manager*® szoftverrel dolgoztuk fel. Az egyes pool-ok analízise után készítettünk egy összefoglaló Excel táblázatot (*Microsoft, Seattle, USA*), amiben a miRNS-ekhez tartozó Ct (detekciós ciklus) értékek szerepeltek. A kapott adatok összehasonlítását a miRNS PCR Array kitet szolgáltató cég online kiértékelő eszközével végeztük el (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>). A triszómiás minták esetében kontrollként a 36-42 éves normál korosztályt, az egyéb szívfejlődési rendellenesség esetében a 30-35 éves korosztályt állítottuk be kontroll csoportként. A relatív kvantifikációhoz az alapbeállítást alkalmaztuk (összes referencia RNS-hez való viszonyítás).

Eredményként megkaptuk, hogy az egyes mintákban mely miRNS-ek mutatnak fokozott vagy csökkent expressziót a normál mintákhoz képest. Ezt összevetettük a különböző szív- és érrendszeri megbetegedésekben megfigyelt változásokkal, majd ez alapján kiválasztottuk jelentősebb miRNS-eket.

#### 4.2.6 Bioinformatikai analízis

A vizsgálat befejező részeként bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével elemeztük a kapott eredményeket. Megvizsgáltuk, hogy a szívfejlődési rendellenességekben és a kardiovaszkuláris megbetegedésekben egyaránt aberráns expressziót mutató miRNS-ek milyen hatással bírhatnak a szívfejlődés folyamatára.

Az Uniprot internetes adatbázis (<http://www.uniprot.org/>) felhasználásával olyan fehérje kódoló géneket kerestünk, melyek részt vesznek a szívfejlődés szabályozásában. A szívfejlődés gén ontológiai (GO) kódja: 0007507. A keresésnél a következő kritériumokat adtuk meg: „*go\_id:0007507 AND organism:"Homo sapiens (Human) [9606]" AND reviewed:yes*”. A kapott géneket a miRWalk webszerverrel (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>) vizsgáltuk tovább, amely több miRNS-target predikciós programot kombinál. Mi ezek közül a Diana-microT, miRanda és Tarbase eszközöket alkalmaztuk, amelyek különféle paramétereket vesznek figyelembe a predikció kiszámításánál (seed régió komplementaritás, konzerváltság stb.). A miRTarBase adatbázis segítségével meghatároztuk (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), hogy a prediktált miRNS-mRNS interakciókat validálták-e valamilyen kísérleti módszerrel (microarray, RT-PCR stb). Az utolsó lépésben megvizsgáltuk, hogy a prediktált target gének közül volt-e olyan, aminek a mutációját összefüggésbe hozták szívfejlődési rendellenességgel. Erre a célra a CHDWiki adatbázist alkalmaztuk forrásként (<http://homes.esat.kuleuven.be/~bioiuser/chdwiki>).

A bioinformatikai analízis alapján megtudtuk, hogy a PCR Array reakciók alapján szignifikánsnak ítélt miRNS-ek milyen szabályozó szereppel bírnak a szívfejlődésben, és hogy megváltozott expressziójuk vezethet-e valamilyen úton veleszületett szívhiba kialakulásához.

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1 A miRNS PCR Array eredményei

A miRNS PCR Array eredményeként megkaptuk, hogy az egyes betegcsoportokban mely miRNS-ek mutatnak fokozott- vagy csökkent expressziót az életkor szerint illesztett normál csoportokhoz képest. Egy miRNS downreguláltnak tekinthető, hogyha a kontroll mintához viszonyított expressziós szintje (FC: fold change) 0,5 érték alatt van, tehát koncentrációja legfeljebb fele akkora; upregulációt abban az esetben állapítunk meg, hogyha ugyanez az érték meghaladja a 2-t, tehát legalább kétszer akkora mennyiségben található meg a kóros mintákban. A megfigyelt változások összesítve a 3. Táblázatban láthatóak.

| PCR Array       | Kórkép |      |      |      | miRNS pool-ok |       |      |      |       |      |
|-----------------|--------|------|------|------|---------------|-------|------|------|-------|------|
| miRNA neve      | MI     | CH   | CM   | DD   | T21           | T18   | VSD  | HLHS | TOF   | Σ    |
| hsa-let-7a-5p   |        |      |      | Up   | 3,78          | 0,67  | 1,32 | 1,26 | 2,50  | -    |
| hsa-let-7b-5p   |        | Up   |      | Up   | 2,13          | 0,31  | 0,83 | 1,09 | 0,98  | -    |
| hsa-let-7c-5p   |        | Up   | Up   | Up   | 5,65          | 0,78  | 1,89 | 3,23 | 14,64 | Up   |
| hsa-let-7d-5p   |        |      |      | Up   | 2,13          | 0,64  | 3,54 | 1,36 | 1,99  | -    |
| hsa-let-7e-5p   | Up     |      |      |      | 1,94          | 0,31  | 3,67 | 2,83 | 15,80 | Up   |
| hsa-let-7f-5p   |        |      |      | Up   | 1,98          | 0,38  | 1,11 | 0,99 | 2,47  | -    |
| hsa-miR-1       | Down   | Down | Down | Up   | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-100-5p  |        |      | Up   |      | 7,77          | 2,15  | 0,95 | 0,78 | 3,34  | Up   |
| hsa-miR-103a-3p |        | Up   | Up   |      | 2,46          | 1,73  | 2,15 | 0,35 | 1,31  | -    |
| hsa-miR-107     | Down   |      |      |      | 0,02          | 0,01  | 0,89 | 0,99 | 1,13  | -    |
| hsa-miR-10b-5p  |        |      | Up   |      | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-122-5p  | Up     |      |      |      | 0,67          | 0,08  | 1,63 | 7,57 | 3,82  | -    |
| hsa-miR-124-3p  |        |      |      | Down | 6,45          | 0,17  | 0,53 | 0,61 | 14,54 | -    |
| hsa-miR-125a-5p |        |      | Down |      | 4,05          | 0,84  | 2,26 | 0,19 | 1,17  | -    |
| hsa-miR-125b-5p |        |      | Up   | Down | 1,67          | 0,67  | 2,14 | 0,51 | 1,13  | -    |
| hsa-miR-126-3p  |        | Down |      |      | 1,84          | 0,99  | 2,26 | 0,12 | 0,59  | -    |
| hsa-miR-130a-3p | Down   |      |      |      | 1,03          | 0,56  | 1,14 | 0,07 | 0,30  | -    |
| hsa-miR-133a-3p |        | Down | Down | Up   | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 7,74  | -    |
| hsa-miR-133b    | Up     | Down | Down |      | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-140-5p  |        | Up   | Up   |      | 1,23          | 4,49  | 6,00 | 0,99 | 1,04  | -    |
| hsa-miR-142-3p  |        | Up   |      |      | 7,51          | 6,90  | 2,94 | 0,04 | 0,92  | Up   |
| hsa-miR-143-3p  | Down   |      | Down | Up   | 14,40         | 24,70 | 8,25 | 0,99 | 2,48  | Up   |
| hsa-miR-144-3p  |        |      |      | Up   | 12,98         | 4,43  | 1,37 | 0,78 | 1,14  | -    |
| hsa-miR-145-5p  | Up     |      | Up   | Up   | 22,92         | 32,82 | 7,49 | 0,11 | 1,20  | Up   |
| hsa-miR-146a-5p | Up     | Up   | Up   |      | 0,83          | 0,50  | 4,98 | 0,21 | 0,48  | Down |
| hsa-miR-149-5p  |        | Down |      |      | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-150-5p  |        | Down |      |      | 2,19          | 2,01  | 4,48 | 0,05 | 0,47  | -    |
| hsa-miR-155-5p  | Down   |      |      |      | 1,47          | 0,23  | 0,72 | 0,99 | 4,35  | -    |
| hsa-miR-15b-5p  | Up     |      |      |      | 2,25          | 0,72  | 3,38 | 0,09 | 0,49  | -    |
| hsa-miR-16-5p   | Down   |      |      |      | 5,13          | 1,73  | 0,64 | 0,02 | 0,36  | -    |
| hsa-miR-17-5p   |        |      |      | Up   | 3,55          | 1,24  | 2,69 | 0,10 | 0,82  | -    |
| hsa-miR-181a-5p |        |      |      | Up   | 0,78          | 0,87  | 1,14 | 0,46 | 2,22  | -    |
| hsa-miR-181b-5p |        | Down | Up   |      | 1,44          | 2,69  | 6,26 | 0,49 | 5,86  | Up   |
| hsa-miR-182-5p  |        | Reg  |      |      | 2,95          | 0,56  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-183-5p  |        |      |      | Down | 0,71          | 0,21  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-185-5p  |        | Down |      |      | 3,18          | 1,74  | 1,29 | 0,18 | 0,42  | -    |
| hsa-miR-18b-5p  |        | Up   |      |      | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 2,03  | -    |
| hsa-miR-195-5p  | Down   | Up   | Up   |      | 9,44          | 2,44  | 1,02 | 0,05 | 1,02  | -    |
| hsa-miR-199a-5p |        | Up   |      |      | 4,00          | 3,60  | 3,57 | 0,66 | 0,85  | Up   |
| hsa-miR-206     |        |      |      | Up   | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-208a-3p | Up     | Up   | Up   | Up   | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-208b-3p | Up     | Up   | Up   |      | 1,47          | 0,23  | 0,35 | 0,99 | 0,80  | -    |
| hsa-miR-21-5p   | Down   | Up   | Up   | Up   | 1,66          | 0,61  | 2,76 | 0,02 | 2,10  | -    |
| hsa-miR-210-3p  |        |      | Up   |      | 1,55          | 0,98  | 0,84 | 0,99 | 7,95  | -    |

|                        |      |      |      |      |              |              |              |             |              |      |
|------------------------|------|------|------|------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|------|
| hsa-miR-214-3p         | Down | Up   | Up   |      | 1,47         | 0,46         | 0,35         | 0,99        | 0,80         | -    |
| <b>hsa-miR-22-3p</b>   | Down |      |      |      | <b>3,75</b>  | <b>3,65</b>  | <b>2,67</b>  | <b>0,05</b> | 1,07         | Up   |
| hsa-miR-221-3p         |      | Up   | Up   |      | 1,80         | <b>2,11</b>  | <b>6,34</b>  | <b>0,28</b> | 1,67         | -    |
| hsa-miR-222-3p         |      | Up   | Up   |      | 1,12         | 0,78         | <b>4,36</b>  | <b>0,17</b> | 1,02         | -    |
| hsa-miR-223-3p         | Up   | Up   |      |      | <b>3,75</b>  | <b>0,00</b>  | <b>8,60</b>  | <b>0,05</b> | <b>0,40</b>  | -    |
| hsa-miR-224-5p         |      | Up   |      |      | <b>3,13</b>  | 0,93         | 1,99         | 0,99        | 1,58         | -    |
| hsa-miR-23a-3p         |      | Up   | Up   |      | 1,15         | 1,05         | <b>2,96</b>  | <b>0,21</b> | <b>0,48</b>  | -    |
| hsa-miR-23b-3p         |      | Up   |      |      | <b>2,58</b>  | 1,24         | <b>2,26</b>  | <b>0,22</b> | <b>0,28</b>  | -    |
| <b>hsa-miR-24-3p</b>   | Down | Up   |      | Up   | <b>4,28</b>  | <b>3,99</b>  | <b>5,48</b>  | <b>0,15</b> | 1,46         | Up   |
| hsa-miR-25-3p          |      | Up   |      |      | <b>3,41</b>  | 0,64         | 0,96         | <b>0,07</b> | <b>0,41</b>  | -    |
| hsa-miR-26a-5p         | Down |      |      | Up   | 1,93         | 0,48         | 2,20         | 0,22        | 0,70         | -    |
| hsa-miR-26b-5p         | Down |      |      |      | <b>2,62</b>  | 0,62         | 1,44         | 0,52        | 1,76         | -    |
| <b>hsa-miR-27a-3p</b>  |      | Up   |      | Up   | <b>2,53</b>  | <b>5,57</b>  | <b>17,45</b> | <b>0,06</b> | 1,76         | Up   |
| <b>hsa-miR-27b-3p</b>  |      | Up   |      | Up   | <b>3,81</b>  | <b>3,70</b>  | <b>4,52</b>  | <b>0,24</b> | 1,35         | Up   |
| <b>hsa-miR-29a-3p</b>  |      | Down |      |      | <b>7,83</b>  | <b>16,41</b> | <b>22,55</b> | 0,71        | <b>2,83</b>  | Up   |
| hsa-miR-29b-3p         |      | Down | Down |      | <b>2,43</b>  | 0,92         | <b>2,21</b>  | <b>0,18</b> | 0,62         | -    |
| <b>hsa-miR-29c-3p</b>  |      | Down |      |      | <b>5,81</b>  | <b>8,15</b>  | <b>5,41</b>  | <b>0,07</b> | 0,87         | Up   |
| hsa-miR-302a-3p        |      |      |      | Down | 1,47         | 0,23         | 0,35         | 0,99        | 3,16         | -    |
| hsa-miR-302b-3p        |      |      |      | Down | 1,47         | 0,23         | 0,35         | 0,99        | 0,80         | -    |
| hsa-miR-30a-5p         |      |      |      | Up   | 1,80         | 1,11         | 1,69         | <b>0,02</b> | 1,38         | -    |
| hsa-miR-30c-5p         |      |      |      | Up   | 1,57         | 0,86         | 1,76         | 0,06        | 0,61         | -    |
| hsa-miR-30d-5p         |      |      |      | Up   | 6,01         | 1,82         | 1,28         | 0,06        | 3,08         | -    |
| hsa-miR-30e-5p         |      | Down |      |      | 1,93         | 1,36         | 1,64         | 0,07        | 0,71         | -    |
| hsa-miR-31-5p          |      | Up   |      |      | 1,47         | 0,23         | 0,35         | 0,99        | 7,47         | -    |
| <b>hsa-miR-320a</b>    | Up   |      |      |      | 0,71         | <b>0,20</b>  | 0,95         | <b>0,46</b> | <b>0,22</b>  | Down |
| hsa-miR-328-3p         |      |      | Up   |      | 0,53         | <b>0,38</b>  | 0,53         | 1,51        | <b>14,84</b> | -    |
| hsa-miR-342-3p         |      |      | Up   |      | <b>0,15</b>  | <b>0,21</b>  | <b>3,15</b>  | <b>0,37</b> | <b>5,62</b>  | -    |
| <b>hsa-miR-365b-3p</b> |      |      | Down |      | <b>6,86</b>  | <b>3,96</b>  | <b>8,91</b>  | 0,91        | 0,74         | Up   |
| hsa-miR-378a-3p        |      |      | Down | Up   | 1,10         | 0,93         | <b>2,58</b>  | <b>0,13</b> | 0,51         | -    |
| <b>hsa-miR-423-3p</b>  |      |      | Up   |      | <b>2,49</b>  | <b>6,31</b>  | <b>3,49</b>  | <b>0,14</b> | <b>2,48</b>  | Up   |
| hsa-miR-424-5p         |      | Up   |      |      | <b>4,46</b>  | <b>6,09</b>  | <b>4,39</b>  | <b>0,04</b> | <b>0,19</b>  | -    |
| hsa-miR-451a           |      | Down |      |      | 6,54         | 2,31         | 1,81         | 0,08        | 0,54         | -    |
| <b>hsa-miR-486-5p</b>  |      | Down |      |      | 1,61         | <b>0,25</b>  | <b>0,23</b>  | <b>0,06</b> | <b>0,19</b>  | Down |
| hsa-miR-494-3p         | Down |      |      |      | 3,94         | 1,45         | 0,71         | 0,99        | 1,71         | -    |
| hsa-miR-499a-5p        | Up   |      | Up   |      | 0,01         | 0,00         | 0,35         | 0,99        | 0,80         | Down |
| hsa-miR-7-5p           |      |      | Down |      | 4,14         | 0,41         | 1,17         | 0,59        | 2,52         | -    |
| hsa-miR-92a-3p         |      |      | Down |      | <b>2,99</b>  | 0,60         | 0,61         | <b>0,07</b> | 0,60         | -    |
| <b>hsa-miR-93-5p</b>   |      | Down |      | Up   | <b>10,77</b> | <b>5,57</b>  | <b>3,59</b>  | <b>0,13</b> | 0,95         | Up   |
| hsa-miR-98-5p          |      |      |      | Up   | 1,47         | 0,13         | 0,82         | 1,14        | 0,80         | -    |
| hsa-miR-99a-5p         |      |      |      | Up   | 0,52         | 0,74         | 1,32         | 0,99        | 1,14         | -    |

**3. Táblázat:** miRNS PCR Array eredményei. Jelölések: kék: downregulált miRNS-ek, piros: upregulált miRNS-ek, szürke: placentában nem expresszálódó miRNS-ek. MI: Myocardialis infarktus, CH: Cardialis Hypertrophia, CM: Cardialis Myopathia, DD: Fejlődés&Differenciáció.

A miRNS-eket a kóros mintákban mutatott megváltozott expressziójuk és a kardiovaszkuláris megbetegedésekben megfigyelt változások alapján különböző szignifikancia-szintű csoportokba soroltuk be:

#### Upregulált miRNS-ek:

**I.** Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott, ebből 2 legalább non-szindromatikus forma; egy betegcsoportban sem downregulálódott; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is overexpressziót mutat: *hsa-let-7c-5p*.

**II.a.** Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott, ebből 2 legalább non-szindromatikus forma; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is overexpressziót mutat: *hsa-let-7e-5p*, *hsa-miR-423-3p*.

**II.b.** Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott; egy betegcsoportban sem downregulálódott; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is overexpressziót mutat: *hsa-miR-100-5p*, *hsa-miR-199a-5p*.

**II.c.** Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott, ebből 2 legalább non-szindromatikus forma; egy betegcsoportban sem downregulálódott; a szív-és érrendszeri kórképekben változatos expressziót mutat: *hsa-miR-143-3p*, *hsa-miR.29a*.

**III.** Legalább 3 betegcsoportban upregulálódott és maximum egy betegcsoportban downregulálódott: *hsa-miR-142-3p*, *hsa-miR-145-3p*, *hsa-miR-181b-5p*, *hsa-miR-22-3p*, *hsa-miR-24-3p*, *hsa-miR-27a-3p*, *hsa-miR-27b-3p*, *hsa-miR-29c-3p*, *hsa-miR-365b-3p*, *hsa-miR-93-5p*.

#### Downregulált miRNS-ek:

**I.** Legalább 3 betegcsoportban downregulálódott, ebből 2 legalább non-szindromatikus forma; egy betegcsoportban sem upregulálódott; továbbá a szív-és érrendszeri kórképekben is underexpressziót mutat: *hsa-miR-486-5p*.

**II.** Legalább 3 betegcsoportban downregulálódott, ebből 2 legalább non-szindromatikus forma; egy betegcsoportban sem upregulálódott; a szív-és érrendszeri kórképekben változatos expressziót mutat: *hsa-miR-320a*.

**III.** Legalább 3 betegcsoportban downregulálódott és maximum egy betegcsoportban upregulálódott: *hsa-miR-146a*.

## **5.2 A bioinformatikai analízis eredményei**

Az Uniprot adatbázisban 407 olyan humán eredetű, fehérje kódoló gént találtunk, amely a szívfejlődés folyamatához kapcsolható. A miRNS PCR Array analízis eredményeként azt kaptuk, hogy a beteg mintákban és a kardiovaszkuláris kórképekben általánosan upregulálódott miRNS-ek a *let-7c*, *let-7e*, *miR-100*, *miR-199a* és *miR-423*; downregulálódott miRNS a *miR-486* volt. Az analízis további részében ezeket a miRNS-eket elemeztük.

- *hsa-let-7c-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 98 a *hsa-let-7c* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy

predikciós program által megjósolt interakció alapján). 44-et ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek 1. Táblázat). A 44 találat közül 4-et validáltak kísérleti módszerekkel: *DICER1* (Western blot [31]), *TGFBR1* (Western blot, reporter assay, RT-PCR [32]), *NOTCH2* (NGS [33], 8. Ábra) és *TAZ* (NGS [33]); 6 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [34]), *CHD7* (CHARGE szindróma [35]), *HAND2* (non-szindromikus VSZR [36]), *NOTCH2* (Alagille szindróma [37]), *SH3PXD2B* (Frank-Ter Haar szindróma [38]) és *TBX5* (Holt-Oram szindróma [39]).

**8. Ábra.** hsa-let-7c - NOTCH2 interakció (forrás: miRTarbase)

- *hsa-let-7e-5p*

- *hsa-miR-423-3p*

egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 12-t ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek 3.Táblázat). A 12 találat közül egyet sem validáltak kísérleti módszerekkel, és csupán 1 gén mutációja vezetett szívfejlődési rendellenességhez: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [34]).

- *hsa-miR-100*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 21 a *hsa-miR-100* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). Ezek közül a *NEBL* gént mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozta meg. A miRNS-mRNS interakciót nem validálták kísérletes eszközökkel, és nem hozták összefüggésbe szívfejlődési rendellenességgel

- *hsa-miR-199a-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 164 a *hsa-miR-199a-5p* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 45-öt ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek 4.Táblázat). A 45 találat közül 2-t validáltak kísérleti módszerekkel: *ERBB2* (Western blot [40]) és *HIF1A* (Riporter assay, Western blot, RT-PCR [41]). 5 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [34]), *JAG1* (Alagille szindróma [42]), *PTPN11* (Nooan szindróma [43]), *NOTCH2* (Alagille szindróma [37]) és *STRA6* (PDAC szindróma [44]).

- *hsa-miR-486-5p*

A miRWalk webszerver alkalmazásával azt az eredményt kaptuk, hogy a 407 gén által kódolt mRNS szekvenciák közül 107 a *hsa-miR-486-5p* miRNS lehetséges célpontja (legalább egy predikciós program által megjósolt interakció alapján). 40-et ezek közül mind a három felhasznált predikciós program potenciális célpontként határozott meg (Mellékletek 5.Táblázat). A 40 találat közül egyet sem validáltak kísérleti módszerekkel. 4 gén mutációja szívfejlődési rendellenességhez vezetett: *ACVR2B* (non-szindromikus VSzR [34]), *FBN1* (Marfan szindróma [45]), *NF1* (Neurofibromatosis [46]) és *NOTCH2* (Alagille szindróma [37]).

## 6. ÉRTÉKELÉS

A humán keringésben fellelhető szabad miRNS-ek szintje relatíve állandó, különböző egyének között konzisztens és stabilitásukat szélsőséges körülmények között is megőrzi. Ezen tulajdonságainak köszönhetően, a keringő miRNS-ek potenciális biomarkerként szolgálhatnak különböző kórképek kimutatására. Számos olyan miRNS ismert, melyeknek a megváltozott expressziója szív- és érrendszeri betegségek jelenlétére utal. Például a *miR-1* plazmában mért koncentrációja szignifikánsan emelkedik akut myocardialis infarctus (AMI) esetében [47]; artéria-koronária betegségben (CAD) pedig a *miR-126* és *miR-17~92a* miRNS-ek szintjének lényeges csökkenését figyelték meg [48].

Azok a miRNS-ek, amelyek a terhesség ideje alatt expresszálódnak a placentában, nagy valószínűséggel kimutathatóak az anyai keringésben. Számos olyan található közöttük, amely részt vesz a szívfejlődés folyamatának szabályozásában, ezáltal összefüggésbe hozható a szívfejlődési rendellenességekkel. Az ilyen sajátosságú, magzati eredetű miRNS-ek vizsgálata új lehetőségeket nyit a non-invazív molekuláris magzati diagnosztikában. Egy kínai kutatócsoport SOLiD szekvenálás segítségével miRNS expressziós vizsgálatot végzett, olyan 18-22 terhességi hétben lévő várandósok szérum mintáiban, akiknek magzatát szívfejlődési rendellenességgel diagnosztizáltak (ASD, VSD vagy TOF). Eredményeik szerint a *hsa-miR-19b*, *hsa-miR-22*, *hsa-miR-29c* és *hsa-miR-375* miRNS-ek szignifikánsan upreguláltak voltak a beteg magzatot hordozó terhes nők keringésében [49]. Li és munkatársai VSD-vel diagnosztizált gyermekektől gyűjtöttek perifériás vérmintát, majd microarray és RT-PCR vizsgálatokat végeztek [50]. 7 downregulált és 1 upregulált miRNS-t azonosítottak, melyek a jobb kamra fejlődésért felelős géneket szabályoznak. Mindazonáltal, a VSD a szívfejlődés folyamán alakul ki, ezért lehetséges, hogy a gyerekek esetében megfigyelt változások a betegség következményei és nem pedig kiváltó okai.

A miRNS PCR Array eredményeként megkaptuk, hogy az egyes betegcsoportokban mely miRNS-ek mutatnak fokozott- vagy csökkent expressziót az életkor szerint illesztett normál csoportokhoz képest. Ezt összevetettük a különböző szív- és érrendszeri megbetegedésekben megfigyelt változásokkal, majd ez alapján kiválasztottuk jelentősebb miRNS-eket: általánosan upregulálódott miRNS-ek a *let-7c*, *let-7e*, *miR-100*, *miR-199a* és *miR-423*; downregulálódott miRNS a *miR-486* volt.

A magzati szív-és érrendszer fejlődése különböző transzkripciós faktorok irányítása alatt áll, melyek bonyolult szabályozási hálózatot alkotnak. Ha a rendszer valamely eleme károsodik, gyakran alakul ki szívfejlődési rendellenesség. Az általunk szignifikánsnak ítélt

miRNS-ek a hálózat több tagját is szabályozhatják: a *let-7c* és *let-7e* miRNS-ek prediktált célgénjei között szerepelnek többek között a *FOXP1*, *HAND2* és *TBX5* transzkripciósfaktorok, melyek nélkülözhetetlenek a szív normál fejlődéséhez. A *miR-199a* miRNS gátolja az érképződési folyamatokat, validált célpontjai a *HIF1A* és *ERBB* gének. Több daganatos megbetegedésben is kimutatták angiogenezis gátló hatását [40]. A *miR-423* fokozott expresszióját figyelték meg szívelégtelenséggel sújtott betegek keringésében [51]. Prediktált targetjei között több növekedési faktor receptor is szerepel (*PDGFRB* és *FGFR2*), ezáltal overexpressziója gátolhatja a fejlődési folyamatokat is. A *miR-486* mind a három, általunk vizsgált szívfejlődési rendellenességben (VSD, HLHS, TOF) csökkent expressziót mutatott. Small és munkatársai leírták, hogy a *miR-486* hiányában szuppresszálódik a *PI3K-Akt* út vonal, ami egy fontos növekedési és túlélési jelpálya [52]. A miRNS egy többszörösen predikált célpontja a *PTEN* gén, ami ezt az útvonalat negatívan szabályozza.

Az előzetes RT-PCR és a miRNS PCR Array analízis eredményeként is azt kaptuk, hogy a *let-7c* miRNS jelentősen upregulálódott a beteg gyermeket hordozó várandósok plazma mintáiban. A *let-7* miRNS család tagjai (13 db miRNS, köztük a *let-7c*) konstitutívan expresszálódnak a szív- és érrendszer főbb sejtjeiben, beleértve a vaszkuláris simaizomsejteket, az endothel sejtet és a koszorúér simaizomsejtjeit [22]. Kóros koncentrációban kardiovaszkuláris megbetegedésekhez vezethetnek, a *let-7b* az AMI [53], a *let-7i* a DCM egy lehetséges biomarkere [54]. Babiarz és munkatársai 2012-ben hiPSC (human induced pluripotent stem cells) eredetű szívizomsejteken végeztek mRNS és miRNS transzkriptomikai vizsgálatot. végeztek. A kapott expressziós profilokat biostatistikai módszerekkel elemezték ki, és azt kapták, hogy a *let-7* miRNS család egy fontos csomópontja a cardiomyocita differenciációt szabályozó miRNS-mRNS hálózatnak [23]. Gu és munkatársai leírták, hogy a *let-7* család tagjai fokozottan expresszálódnak a méhlepényben [30], ezért feltehetően megtalálhatóak az anyai keringésben is.

A *let-7c* a 21-es kromoszóma q21.2 régiójában, a *C21orf34* gén egy intronjában helyezkedik el. Expresszióját feltehetően a gén promótere szabályozza. Coppola és munkatársai 2013-ban kísérletesen bebizonyították, hogy a *let-7c* részt vesz a cardiomyogenesis szabályozásában: célpontja egy olyan metil-transzferáz enzim (*Ezh2*), amely kulcsfontosságú, a szívfejlődésben szerepet játszó transzkripciósfaktorokat csendesít (ezáltal a miRNS serkenti a folyamatot) [24]. Thum és munkatársai azt találták, hogy a *let-7c* expressziós mintázata nagy hasonlóságot mutat krónikus szívelégtelenségben és magzati szívben. Ebből arra következtettek, hogy a betegség a fetális gén program reaktivációjával jellemezhető, és ezt a változást vélhetően miRNS-ek (köztük a *let-7c*) idézik elő [55].

Az általunk végzett bioinformatikai analízis szerint a *NOTCH2* gén a *let-7c* miRNS fontos célpontja és a gén csendesítése szívfejlődési rendellenességhez vezethet: a gént a felhasznált predikciós programok a *hsa-let-7c* potenciális célpontjaként határozták meg; kísérletesen validálták a miRNS-mRNS interakciót; továbbá a gén mutációja szívhiba kialakulásához vezetett. A *NOTCH2* fontos szerepet játszik a velőcső eredetű vaszkuláris simaizom sejtek proliferációjának szabályozásában és nélkülözhetetlen a szív kiáramlási pályájának megfelelő kifejlődéséhez [56]. Az Alagille szindróma egy szívfejlődési rendellenességgel jellemezhető komplex, dominánsan öröklődő kórkép. A betegség kialakulásának oka a Notch szignalizációs útvonal diszfunkciója, melyért az esetek egy részében a *NOTCH2* gén mutációja tehető felelőssé [37]. Mindezek alapján arra következtettünk, hogy a *let-7c* miRNS a veleszületett szívfejlődési rendellenesség potenciális biomarkere, és a közeljövőben alkalmazható lehet a betegség kiszűrésére.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

A veleszületett szívfejlődési rendellenességek a leggyakoribb fejlődési rendellenességek közé tartoznak. Súlyosságuktól és korrigálhatóságuktól nagyban függ a gyermek várható élettartama, ezért fontos a terhesség alatti korai felismerés. Egyre nagyobb az igény olyan biomarkerekre, amelyek segítségével megbízhatóan kimutatható a betegség. Ígéretes megoldást kínálnak az anyai keringésben fellelhető magzati eredetű miRNS-ek, melyek több, a szívfejlődés folyamatában résztvevő gén expresszióját is szabályozzák.

A kutatás során célkitűzésünk volt a szívfejlődési rendellenességgel kapcsolatos miRNS-ek expressziós mintázatának elemzése anyai plazmában; végső soron potenciális miRNS biomarkerek keresése a betegség kimutatására.

A vizsgálatok elvégzéséhez 38 egészséges, valamint 39, ultrahang vizsgálat során igazolt szívhibás magzatot viselő várandóstól gyűjtöttünk perifériás vérmintát. A kóros terhességek között intrauterin karyotipizálással 12 db magzati aneuploidát igazoltunk. A vérmintákat lecentrifugáltuk, majd a plazmából miRNS extrakciót végeztünk. A minták össz-miRNS koncentrációját spektrofotométerrel meghatároztuk, majd ez alapján 7 pool-t készítettünk: I. 21-es triszómia, II. 18-as triszómia, III. VSD, IV. HLHS, V. TOF, VI. Normál\_30-35, VII. Normál\_36-42. Az így kapott mintákon miRNS PCR Array analízist végeztünk, a szív-és érrendszeri betegségekre specifikus panel felhasználásával. A panel 84 miRNS vizsgálatát teszi lehetővé, ezek közül csak a placentában is jelenlévőeket vettük figyelembe. A triszómiás mintákat 36-42 éves, az egyéb szívfejlődési rendellenességeket a 30-35 éves normál korosztállyal hasonlítottuk össze. Bioinformatikai adatbázisok és miRNS-target predikciós programok segítségével elemeztük a kapott eredményeket.

A beteg mintákban és a kardiovaszkuláris kórképekben általánosan upregulálódott miRNS-ek a *let-7c*, *let-7e*, *miR-100*, *miR-199a* és *miR-423*; downregulálódott miRNS a *miR-486* volt. A miRNS PCR Array analízis eredményeként és az előzetes vizsgálatok elvégzésekor is azt kaptuk, hogy a *hsa-let-7c* miRNS jelentősen upregulált a beteg magzatot hordozó várandósok plazma mintáiban. A bioinformatikai analízis alapján arra következtettünk, hogy a *NOTCH2* gén a *hsa-let-7c* miRNS fontos célpontja és a gén csendesítése szívfejlődési rendellenességhez vezethet.

Kutatásunk eredményeként több potenciális biomarkert találtunk, amelyek a későbbiekben alkalmazhatóak lehetnek a veleszületett szívfejlődési rendellenességek korai kimutatására. További célkitűzésünk a markerek validálása RT-PCR módszerrel és a különböző szívhibák kialakulási mechanizmusának pontos feltérképezése.

## 8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Capozzi G., Caputo S. et al., „Congenital heart disease in live-born children: incidence, distribution, and yearly changes in Campani Region.”, *J Cardiovasc Med*, 9(4):368-374, 2008
- [2] Freeman S.B., Bean L.H. et al. „Ethnicity, sex, and the incidence of congenital heart defects: report from the National Down Syndrome Project”, *Genet. Med.*, 10:173-180, 2008
- [3] Fahed A.C., Nemer G.M., „Genetic Causes of Syndromic and Non-Syndromic Congenital Heart Disease”, *Mutations in Human Genetic Disease*, Chapter 6, 2012
- [4] Bruneau, „The developmental genetics of congenital heart disease”, *Nature*, 451:943-948, 2008
- [5] Park HK, Park YH., „Fetal surgery for congenital heart disease”, *Yonsei Medical Journal*, 42(6):686-694, 2001
- [6] Artz W., Tulzer G.; „Fetal surgery for cardiac lesions”, *Prenatal Diagnosis*, 31:695-698, 2011
- [7] Bán Z., Papp Z., „Prenatális és preimplantációs diagnosztika”, *Magyar Tudomány*, 3:322-330, 2006
- [8] Nagy B., Lázár L., Rigó J., *Praenatalis Molekuláris Genetika*. Budapest, Semmelweis Kiadó, 2011
- [9] Tounta G., Kolialexi A. et al. „Non-invasive prenatal diagnosis using cell-free fetal nucleic acids in maternal plasma: Progress overview beyond predictive and personalized diagnosis” *EPMA Journal*, 2:162-171, 2011
- [10] Bianchi D.W., Platt L.D. et al., „Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing”, *Obsterics & Gynacology*, 119(5):890-901, 2012
- [11] Rasiyah SV, Publicover M. et al., „A systematic review of the accuracy of first-trimester ultrasound examination dor detecting major congenital heart disease”, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 28(1):110-116, 2006
- [12] Tegnader E., Eik-Nes SH., „The examiner’s ultrasound experience has a dignificant impact on the detection rate of the congenital heart defects at the second-trimester fetal examination”, *Ultrasound Obstet Gynecol*, 28(1):8-14, 2006
- [13] Masszi Gy., Hajdú J., „Magzati kardiológiáról gyermekgyógyászoknak”, *Gyermekegyógyászati Továbbképző Szemle*, 2014
- [14] Bruns RF, Moron AF et al., „The role of nuchal translucency in the screening for congenital heart defects”, *Arq Bras Cardiol*, 87(3):307-314, 2006

- [15] Jeliffe-Pawlowski LL., Walton-Haynes L. et al., „Using second trimester ultrasound and maternal serum biomarker data to help detect congenital heart defects in pregnancies with positive triple-marker screening results”, *Am J Med Genet A*, 146A(19):2455-2467, 2008
- [16] Lewis B.P., Burge C.B. et al., „Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicated that thousands of human genes are microRNA targets”, *Cell*, 120:15-20, 2005
- [17] Yates L. A., Norbury C. J. et al., "The Long and Short of MicroRNA", *Cell*, 153:516-519, 2013
- [18] Winter J, Jung S. et al., „Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation”, *Nat Cell Biol*, 11(3):228-234, 2009
- [19] Chen JF, Mandel EM et al., „The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation”, *Nat. Genet.*, 38: 228-233, 2006
- [20] van Rooij E., Quiat D., „A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance”, *Dev. Cell*, 17:662-673, 2009
- [21] Ji R, Cheng Y et al., „MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of microRNA in vascular neointimal lesion formation”, *Circ Res*, 100:1579-1588, 2008
- [22] Bao MH., Feng X. et al. „Let-7 in cardiovascular diseases, heart development and cardiovascular differentiation from stem cells”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14:23086-23102, 2013
- [23] Babiarz J.E., Morgane Ravon M. et al. „Determination of the Human Cardiomyocyte mRNA and miRNA Differentiation Network by Fine-Scale Profiling”, *Stem Cells And Development*, 21 (11): 1956-1965, 2012
- [24] Coppola A., Romito A. et al. „Cardiomyogenesis is controlled by the miR-99a/let-7c cluster and epigenetic modifications”, *Stem Cell Research*, 12:323–337, 2014
- [25] Chen X., Ba Y. et al., „Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases”, *Cell Research*, 18:997-1006, 2008
- [26] Chim SS, Shing KF et al., „Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma”, *Clinical Chemistry*, 54(3):482-490, 2008
- [27] Yu Z., Han S. et al. „Potential role of maternal serum microRNAs as biomarker for fetal congenital heart defects”, *Medical Hypotheses*, 76: 424-426, 2011
- [28] Morales-Prieto DM, Chaiwnagyen W. et al., „MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells”, *Placenta*, 33 :725-734, 2012

- [29] Fu G., Brkic J. et al., „MicroRNA in human placental development and pregnancy complications”, *Int. J. Mol. Sci.*, 14:5519-5544, 2013
- [30] Gu Y., Sun J. et al. „Differential miRNA expression profiles between the first and the third trimester human placentas”, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 304: E836-E843, 2013
- [31] Tokumaru S, Suzuki M et al., „let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop”, *Carcinogenesis*, 29(11):2073-2077, 2008
- [32] Tzur G, Israel A et al. „Comprehensive gene and microRNA expression profiling reveals a role for microRNAs in human liver development”, *PLoS One*, 20;4(10):e7511, 2009
- [33] Helwak A, Kudla G et al. „Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding”, *Cell*, 153(3):654-665, 2013
- [34] Kosaki R, Gebbia M et al. „Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB”, *Am J Med Genet*, 1;82(1):70-76., 1999
- [35] Aramaki M, Udaka TJ et al., „Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations”, *Pediatr.*, 148(3):410-414, 2006
- [36] Shen L., Li XF et al. „Transcription factor HAND2 mutations in sporadic Chinese patients with congenital heart disease.”, *Chin Med J. (Eng)*, 123(13):1623-1627, 2010
- [37] McDaniell R., Warthen D.M. et al., „NOTCH2 Mutations Cause Alagille Syndrome, a Heterogenous Disorder of the Notch signaling Pathway”, *Am. J. Hum. Genet.*, 79:169-173, 2006
- [38] Iqbal Z, Cejudo-Martin P et al., „Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome.”, *Am J Hum Genet.*, 86(2):254-261, 2010
- [39] Gruenauer-Kloevekorn C, Froster UG., „Holt-Oram syndrome: a new mutation in the TBX5 gene in two unrelated families.”, *Ann Genet.*, 46(1):19-23, 2003
- [40] He J, Jing Y et al. „Roles and mechanism of miR-199a and miR-125b in tumor angiogenesis.”, *PLoS One*; 8(2):e56647., 2013
- [41] Rane S, He M et al. „Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes.”, *Circ Res.*, 104(7):879-86, 2009
- [42] McElhinney DB, Krantz ID et al., „Analysis of cardiovascular phenotype and genotype-phenotype correlation in individuals with a JAG1 mutation and/or Alagille syndrome.”, *Circulation*, 106(20):2567-74., 2002

- [43] Sznajder Y, Keren B et al., „The spectrum of cardiac anomalies in Noonan syndrome as a result of mutations in the PTPN11 gene.”, *Pediatrics*, 119(6):e1325-31., 2007
- [44] Segel R, Levy-Lahad E et al., „Pulmonary hypoplasia-diaphragmatic hernia-anophthalmia-cardiac defect (PDAC) syndrome due to STRA6 mutations--what are the minimal criteria? ”, *Am J Med Genet A*, 149A(11):2457-63., 2009
- [45] Faivre L, Collod-Beroud G et al., „Effect of mutation type and location on clinical outcome in 1,013 probands with Marfan syndrome or related phenotypes and FBN1 mutations: an international study.”, *Am J Hum Genet.*, 81(3):454-66., 2007
- [46] Lin AE, Birch PH et al., „Cardiovascular malformations and other cardiovascular abnormalities in neurofibromatosis 1.”, *Am J Med Genet.*, 95(2):108-17, 2000
- [47] Ai J., Zhang R. et al. „Circulating microRNA-1 as potential novel biomarker for acute myocardial infarction in humans”, *Biochem Biophys Res Commun*, 391:73-77, 2010
- [48] Fichtlscherer S, De Rosa S et al., „Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease.”, *Circ Res.*, 107:677– 684., 2010
- [49] Zhu S., Cao L. et al., „Identification of maternal serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for prenatal detection of fetal congenital heart defects”, *Clinical Chimica Acta*, 424:66-72, 2013
- [50] Li D, Ji L et al., „Characterization of circulating microRNA Expression in patients with Ventricular Septal Defect”, *Plos One*, 9(8):e106318, 2014
- [51] Tijssen AJ, Creemers EE et al., „MiR423–5p as a circulating biomarker for heart failure”, *Circ Res.*, 106:1035–1039., 2010
- [52] Small EM, O’Rourke et al., „Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle enriched microRNA-486”, *PNAS*, 107(9):4218-23, 2010
- [53] Long G., Wang F. et al., „Circulating miR-30a, miR-195 and let-7b associated with acute myocardial infarction.”, *PLoS One*, 7:e50926, 2012
- [54] Mamoru S., Yoshitaka M. et al., „A cellular microRNA, let-7i, is a novel biomarker for clinical outcome in patients with dilated cardiomyopathy.”, *J. Card. Fail.*, 17:923–929, 2011
- [55] Thum T., Galuppo, P. et al., „MicroRNAs in the human heart: A clue to fetal gene reprogramming in heart failure.”, *Circulation*, 116:258–267, 2007
- [56] Varadkar P., Kraman M. et al., „Notch2 is required for the proliferation of cardiac neural crest-derived smooth muscle cells”, *Developmental Dynamics*, 237:1144-1152, 2008

## 9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Munkám elkészítéséhez nyújtott segítségükért köszönetemet szeretném kifejezni:

- Dr. Rigó János Jr. professzornak, aki lehetővé tette, hogy a diplomához szükséges vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I.Sz. Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán végezhessem el.
- Programvezetőmnek, Dr. Lázár Leventének, aki biztosította számomra, hogy bekapcsolódjak a mikroRNS-ekkel kapcsolatos kutatómunkába, és aki mindvégig figyelemmel kísérte és támogatta tudományos diákköri tevékenységemet.
- Témavezetőmnek, a Genetikai Laboratórium vezetőjének, Dr. Nagy Bálintnak, aki töretlen lelkesedésével és magas színvonalú szakmai tudásával irányította és segítette munkámat.
- Gnotek Edit asszisztensnek, aki a laboratóriumban végzett munkában segítséget nyújtott és hasznos szakmai tanácsokkal látott el.
- Dr. Gilda Cobellis-nek, a Seconda Università di Napoli kutatójának, aki biztosította a lehetőséget és a szükséges eszközöket az Olaszországban végzett kutatások elvégzéséhez.